ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER HYALURONIDASEAKTIVITÄT DURCH NOVOCAIN UND HUMINSÄUREN

Walter Erhard

1968

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER HYALURONIDASEAKTIVITÄT DURCH NOVOCAIN UND HUMINSÄUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Walter Erhard
aus Stockdorf

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv.-Doz. Dr. H. MATHIES
Korreferent: Prof. Dr. W. SEITZ
Dekan: Prof. Dr. F. HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 1. 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

M E I N E N E L T E R N

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

PROBLEMATIK	5
METHODIK	6
VERSUCHSREIHEN	8
TABELLEN UND KURVEN	10
STATISTISCHE AUSWERTUNG	26
DISKUSSION	36
ZUSAMMENFASSUNG	37
LITERATURVERZEICHNIS	39

PROBLEMATIK

Die erhöhte Hyaluronidaseaktivität im rheumatischen Krankheitsgeschehen wurde in verschiedenen Literaturangaben der letzten Jahre erwähnt. Mathies und Mitarbeiter (1, 2) haben in umfangreichen Untersuchungen auf die Bedeutung der hyaluronidasehemmenden Substanzen für die antirheumatische Therapie hingewiesen.
Die Hyaluronidase, auch spreading factor genannt, depolymerisiert als spezifisches Ferment ein Mucopolysaccharid, die Hyaluronsäure. Zusammen mit der Mucoitinschwefelsäure und der Chondroitinschwefelsäure bildet diese die Hauptkomponente der Grundsubstanz.
Ist die Hyaluronidaseaktivität erhöht, so resultiert ein vermehrter Abbau von Hyaluronsäure und damit eine vermehrte Permeabilität der Interzellularsubstanz. Es kommt zu einem perivaskulären Ödem, wodurch der Sauerstoffaustausch zwischen Blut und Gewebe gestört ist. Als Hypoxämieschmerzen sind nach Good und Fleckenstein (3, 4) besonders die Schmerzen des Muskelrheumatismus zu erklären.
Fast alle in der Rheumatherapie angewandten Substanzen zeigen eine hyaluronidasehemmende Wirkung, so auch das Moor, in dem die Huminsäuren wirksam sind (Mathies 5-7; Schliephake und Smets 8; Kowarschik 9; Lachmann 10). In mehreren früheren Arbeiten (Stojanoff 11; Lutz 12; Achtiani 13; Haupt 14) wurde diese Aktivität des Moores verschiedener Vorkommen nachgewiesen.
Das Moor wurde den Versuchstieren in Form von verschiedenartigen Bädern verabreicht. Osterburg (15) hat unter Verwendung extrahierter Huminsäuren aus dem Moorvorkommen eines südbrasilianischen Moores die hyaluronidasehemmende Wirkung intraperitoneal applizierter Huminsäuren nachgewiesen.
Joachimovits (16) hatte die Beobachtung gemacht, daß Moorbäder einen besseren Effekt zu haben scheinen, wenn den Patienten vorher Novocaininjektionen verabreicht werden. Die Moorbäder bei den Patienten wurden mit dem Material des Moorvorkommens durchgeführt, aus dem auch die erwähnten Huminsäuren extrahiert wurden.
Es sollte in der vorliegenden Arbeit deshalb untersucht werden, ob im Tierversuch die Huminsäuren in zwei verschiedenen Konzentrationen bei intraperitonealer Verabreichung einen stärkeren hyaluronidasehemmenden Effekt aufweisen, wenn gleichzeitig Novocain intravenös verabreicht wird. Außerdem war zu untersuchen, welchen Einfluß eine Novocainapplikation auf die Hyaluronidaseaktivität ausübt.

METHODIK

Als Versuchstiere wurden 200-280 g schwere, weiße, männliche Ratten verwendet. Narkotisiert wurden die Tiere durch subcutane Applikation von Evipan-Natrium (10 %ige Lösung, durchschnittlich 30 mg pro 100 g Tier). Zur Aufrechterhaltung einer entsprechenden Narkosetiefe wurden 0,2 ccm der Evipanlösung bei längerer Dauer nachgespritzt. Für jeden Versuch wurden jeweils sechs Ratten verwendet, die auf Holztafeln aufgespannt wurden.
Vor Applikation der Versuchssubstanzen wurde auf die mittels Pilca enthaarte Bauchhaut der Ratten mit einer 1 ccm Tuberculinspritze je eine Farbstoff- und eine Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel intracutan gesetzt. Für die Farbstoff-Quaddel wurden 0,1 ml einer 0,06 %igen Evansbluelösung injiziert, für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel die gleiche Menge der gleichen Farbstofflösung, die jedoch 75 IE Kinetin pro ml Farbstofflösung enthielt, womit 7,5 IE in der verwendeten Farbstofflösung zur Wirkung kamen. Zu verschiedenen Versuchszeiten nach Applikation der zu prüfenden Wirksubstanzen wurden wiederum Quaddeln beider Typen gesetzt, wobei die Farbstoffausbreitung zu der der Vorquaddeln in Beziehung gesetzt wurde. Gemessen wurde jeweils die nach 10 min erreichte Farbstoffausbreitung durch Markierung auf der Bauchhaut der Ratten, anschließende Übertragung auf einen Zelluloidstreifen und planimetrische Ausmessung. Die Angabe der Meßwerte erfolgte in mm^2 der Farbstoffausbreitung, die Auswertung erfolgte als Mittelwertsdifferenz gegenüber dem Ausgangswert.
Die in physiologischer Kochsalzlösung nicht löslichen kristallinen Huminsäuren wurden in Tyloseschleim suspendiert. Von der zuerst im Mörser pulverisierten Menge wurden 10 mg abgewogen und mit 100 ml Tyloseschleim versetzt. Im Wasserbad wurde dann kurz bis auf 70 Grad Celsius erhitzt. Diese Suspension diente als Stammlösung, von ihr wurden die entsprechenden Verdünnungen hergestellt, und zwar 1 : 10 und 1 : 500, das sind 0,001 mg bzw. 0,00002 mg der Huminsäuren.
In einem Leerversuch hatte Osterburg (15) bereits nachgewiesen, daß der Tyloseschleim keine isolierten Wirkungen auf die Hyaluronidase entfaltet.
Bei einem Teil der Ratten wurde die entsprechend verdünnte Huminsäuresuspension allein intraperitoneal injiziert, beim anderen Teil gleichzeitig Huminsäuren und 2 %iges Novocain jeweils in der Menge von 0,1 ml. Das Novocain wurde in die hierfür freigelegte Femoralvene gespritzt.
Ein Leerversuch wurde mit alleiniger Novocaininjektion unternommen, um eventuell isolierte Wirkungen des Novocains auf die Hyaluronidaseaktivität zu erfassen.

Vom Zeitpunkt der Huminsäure- bzw. der Novocainapplikation aus gerechnet wurden nach 30 und 60 Minuten in der einen Versuchsreihe, nach 90 und 120 Minuten, bzw. 150 und 180 Minuten in den anderen Reihen neue Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln gesetzt (F_{30}, FH_{30}; F_{60}, FH_{60}; und F_{90}, FH_{90}; F_{120}, FH_{120}; sowie F_{150}, FH_{150}; F_{180}, FH_{180}).

Auf der enthaarten Bauchhaut der Tiere wurden im Laufe des Versuches je drei Quaddelpaare gesetzt. Wichtig war es, daß keine Quaddeln oberhalb des Rippenbogens und in die Leistenbeuge gesetzt wurden. Um Fehler in der Ausbreitung der Quaddeln auf der Bauchhaut der verschiedenen Ratten auszugleichen, wurde die Lokalisation der Quaddeln systematisch nach der Vorschrift des folgenden lateinischen Quadrats geändert.

	I	II	III	IV	V	VI
1	FH_{60}	F_{30}	F_{60}	F_V	FH_V	FH_{30}
2	F_{30}	F_{60}	F_V	FH_V	FH_{30}	FH_{60}
3	F_{60}	F_V	FH_V	FH_{30}	FH_{60}	F_{30}
4	F_V	FH_V	FH_{30}	FH_{60}	F_{30}	F_{60}
5	FH_V	FH_{30}	FH_{60}	F_{30}	F_{60}	F_V
6	FH_{30}	FH_{60}	F_{30}	F_{60}	F_V	FH_V

Lokalisation auf dem Rattenbauch

Im obigen lateinischen Quadrat sind der Zeit 30 die Zeiten 90 und 150 Minuten gleichzusetzen, ebenso der Zeit 60 die Zeiten 120 und 180 Minuten. I - VI bezeichnet die Nummer des Versuchstieres, 1-6 die Lokalisation auf dem Rattenbauch.

V E R S U C H S R E I H E N

Versuchsreihe 1:

In dieser Reihe wurde geprüft, ob das 2 %ige Novocain allein eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität ergibt. Nach oben beschriebener Methode wurde die Hemmung bestimmt und zwar,

a) 30' und 60' nach Applikation des Novocain
b) 90' und 120' nach Applikation des Novocain
c) 150' und 180' nach Applikation des Novocain

Die Ergebnisse finden sich in den Tabellen 1-3 und in Abbildung 1.

Versuchsreihe 2:

In der zweiten Reihe wurde die hyaluronidasehemmende Wirkung der Huminsäuren in der Konzentration von 1 : 10 (0,001 mg Huminsäuren pro 0,1 ml) untersucht.

a) 30' und 60' nach Applikation des Huminsäuregemisches
b) 90' und 120' nach Applikation des Huminsäuregemisches

Die Ergebnisse finden sich in den Tabellen 4 und 5 und in Abbildung 2.

Versuchsreihe 3:

Hier wurde die hyaluronidasehemmende Wirkung der Huminsäuren in der Konzentration von 1 : 500, bezogen auf die Stammlösung, bestimmt (Es wurden also 0,00002 mg der Huminsäuren pro 0,1 ml gegeben).

a) 30' und 60' nach Applikation der Huminsäuren
b) 90' und 120' nach Applikation der Huminsäuren
c) 150' und 180' nach Applikation der Huminsäuren

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6-8 und in Abbildung 3 festgehalten.

Versuchsreihe 4:

Nun wurde die hemmende Wirkung bei gleichzeitiger Gabe von Huminsäuren 1 : 10, bezogen auf die Stammlösung (also 0,001 mg pro 0,1 ml) und 2 %igem Novocain geprüft.

a) 30' und 60' nach Applikation von Huminsäuren und Novocain
b) 90' und 120' nach Applikation von Huminsäuren und Novocain

Die Ergebnisse finden sich in den Tabellen 9 und 10 und in Abbildung 4.

Versuchsreihe 5:

In dieser Reihe wurde die hemmende Wirkung bei Gabe von Huminsäuren 1 : 500 (= 0,00002 mg pro 0,1 ml) und 2 %igem Novocain gemessen.

a) 30' und 60' nach Applikation von Huminsäuren und Novocain
b) 90' und 120' nach Applikation von Huminsäuren und Novocain
c) 150' und 180' nach Applikaton von Huminsäuren und Novocain

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11-13 und in Abbildung 5 dargestellt.
In den Abbildungen 6 und 7 sowie 8 und 9 wird der Verlauf der Einzelkurven noch einmal zusammenfassend dargestellt.

TABELLEN

TABELLE 1

Tier	Gewicht	F_v	F_{30}	F_{60}	FH_v	FH_{30}	FH_{60}
I	260 g	128	119	135	233	236	208
II	220 g	115	114	115	234	200	213
III	255 g	101	98	109	215	216	190
IV	260 g	113	103	125	212	212	196
V	215 g	109	117	94	195	194	195
VI	240 g	109	117	107	220	189	220
MW		112	111	114	218	208	204
D			-1	+2		-10	-14

MW = Mittelwerte der Einzelwerte
D = Differenz zum Ausgangswert der Mittelwerte (F_v, FH_v)

TABELLE 2

Tier	Gewicht	F_v	F_{90}	F_{120}	FH_v	FH_{90}	FH_{120}
I	195 g	140	100	130	230	220	197
II	260 g	122	129	117	210	183	180
III	285 g	137	119	110	211	205	200
IV	330 g	146	117	104	221	187	182
V	250 g	128	129	125	244	196	200
VI	290 g	125	120	117	243	200	205
MW		133	119	117	226	199	194
D			-14	-16		-27	-32

TABELLE 3

Tier	Gewicht	F_v	F_{150}	F_{180}	FH_v	FH_{150}	FH_{180}
I	240 g	153	131	99	231	229	169
II	210 g	98	117	127	223	198	175
III	210 g	130	115	114	204	212	224
IV	230 g	111	125	121	219	166	169
V	270 g	101	124	93	191	198	203
VI	280 g	122	125	97	245	216	164
MW		119	123	109	219	203	184
D			+4	-10		-16	-35

TABELLE 4

Tier	Gewicht	F_v	F_{30}	F_{60}	FH_v	FH_{30}	FH_{60}
I	250 g	81	79	100	200	149	187
II	235 g	107	95	94	200	185	135
III	310 g	116	105	112	223	170	164
IV	245 g	107	92	105	212	194	177
V	235 g	103	88	87	170	134	193
VI	305 g	110	104	103	198	160	178
MW		104	94	100	200	165	172
D			-10	-4		-35	-28

TABELLE 5

Tier	Gewicht	F_v	F_{90}	F_{120}	FH_v	FH_{90}	FH_{120}
I	260 g	95	97	95	194	172	171
II	265 g	108	99	104	198	152	167
III	215 g	112	89	110	251	220	185
IV	255 g	123	99	107	190	167	190
V	280 g	134	111	111	196	164	177
VI	280 g	83	82	97	199	168	175
MW		109	96	104	205	174	177
D			-13	-5		-31	-28

TABELLE 6

Tier	Gewicht	F_v	F_{30}	F_{60}	FH_v	FH_{30}	FH_{60}
I	225 g	100	121	127	194	242	198
II	285 g	136	110	121	214	194	191
III	235 g	109	124	112	217	237	193
IV	255 g	109	89	117	214	197	201
V	215 g	130	107	114	190	202	214
VI	265 g	148	106	110	213	186	171
MW		122	110	118	207	209	175
D			-12	-4		+2	-12

TABELLE 7

Tier	Gewicht	F_v	F_{90}	F_{120}	FH_v	FH_{90}	FH_{120}
I	230 g	137	114	134	243	204	167
II	265 g	111	133	120	205	199	219
III	215 g	111	115	101	228	182	205
IV	260 g	109	104	102	187	165	183
V	235 g	141	138	127	210	223	197
VI	235 g	125	108	121	244	229	240
MW		122	119	118	219	200	202
D			-3	-4		-19	-17

TABELLE 8

Tier	Gewicht	F_v	F_{150}	F_{180}	FH_v	FH_{150}	FH_{180}
I	330 g	131	116	86	201	160	153
II	310 g	119	114	126	227	202	204
III	315 g	140	116	109	233	195	170
IV	295 g	140	108	114	255	208	190
V	285 g	129	129	115	233	190	171
VI	325 g	129	126	120	230	178	212
MW		131	118	111	229	189	183
D			-13	-20		-40	-46

TABELLE 9

Tier	Gewicht	F_v	F_{30}	F_{60}	FH_v	FH_{30}	FH_{60}
I	235 g	122	110	107	229	200	192
II	205 g	112	118	135	243	211	194
III	260 g	125	130	105	233	230	190
IV	240 g	126	116	104	214	182	194
V	265 g	136	120	113	232	227	187
VI	235 g	121	113	113	244	179	183
MW		124	118	113	233	205	190
D			-6	-11		-28	-43

TABELLE 10

Tier	Gewicht	F_v	F_{90}	F_{120}	FH_v	FH_{90}	FH_{120}
I	305 g	136	123	108	215	165	201
II	275 g	131	114	120	208	168	201
III	260 g	143	139	125	243	199	186
IV	305 g	122	92	111	199	180	177
V	230 g	138	122	128	238	203	174
VI	320 g	128	100	117	241	187	190
MW		133	115	118	224	184	188
D			-18	-15		-40	-36

TABELLE 11

Tier	Gewicht	F_v	F_{30}	F_{60}	FH_v	FH_{30}	FH_{60}
I	195 g	114	122	107	194	154	182
II	275 g	114	120	110	188	175	182
III	250 g	127	121	112	226	214	191
IV	245 g	105	92	99	219	190	185
V	260 g	121	114	81	202	188	189
VI	250 g	124	110	121	200	225	195
MW		117	113	105	205	191	187
D			-4	-12		-14	-18

TABELLE 12

Tier	Gewicht	F_v	F_{90}	F_{120}	FH_v	FH_{90}	FH_{120}
I	225 g	104	106	104	200	194	187
II	250 g	124	118	105	199	203	171
III	260 g	124	113	112	203	193	162
IV	235 g	117	114	111	226	206	174
V	250 g	147	129	110	230	212	173
VI	245 g	126	118	116	216	189	197
MW		123	116	110	212	199	177
D			-7	-13		-13	-35

TABELLE 13

Tier	Gewicht	F_v	F_{150}	F_{180}	FH_v	FH_{150}	FH_{180}
I	270 g	121	127	92	234	213	144
II	250 g	104	115	109	212	185	194
III	210 g	149	121	136	231	242	189
IV	270 g	137	128	135	234	193	174
V	210 g	120	110	103	238	161	145
VI	250 g	128	128	120	246	229	225
MW		126	121	116	232	204	179
D			-5	-10		-28	-53

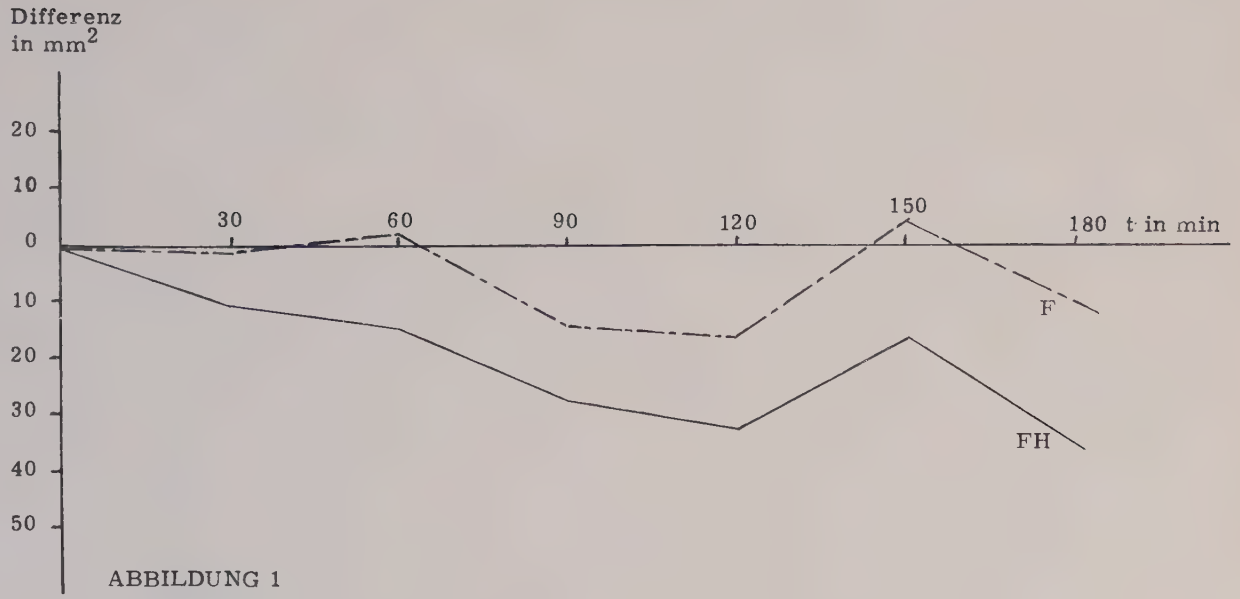

Differenz
in mm2
20
10
0
10
20
30
40
50
30
60
90
120
150
180
t in min
F
FH

ABBILDUNG 1

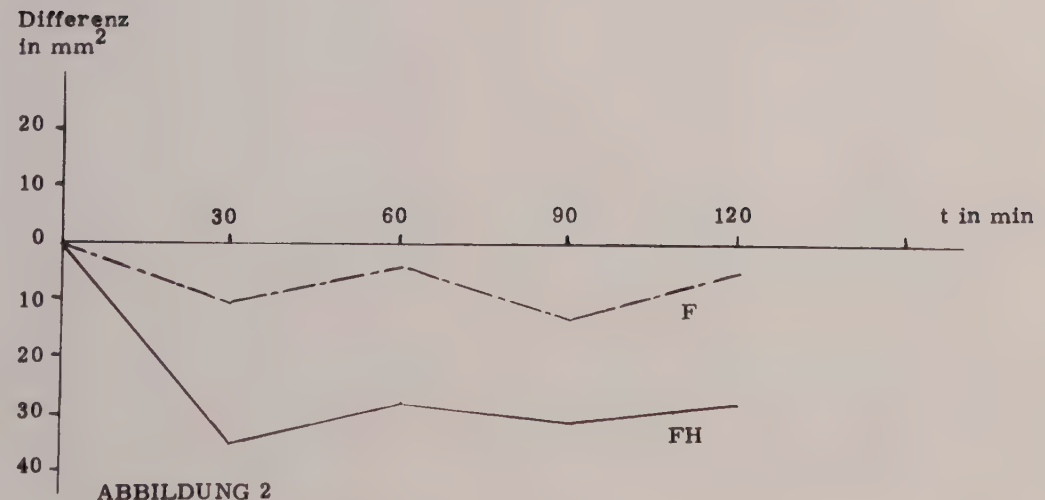


ABBILDUNG 2

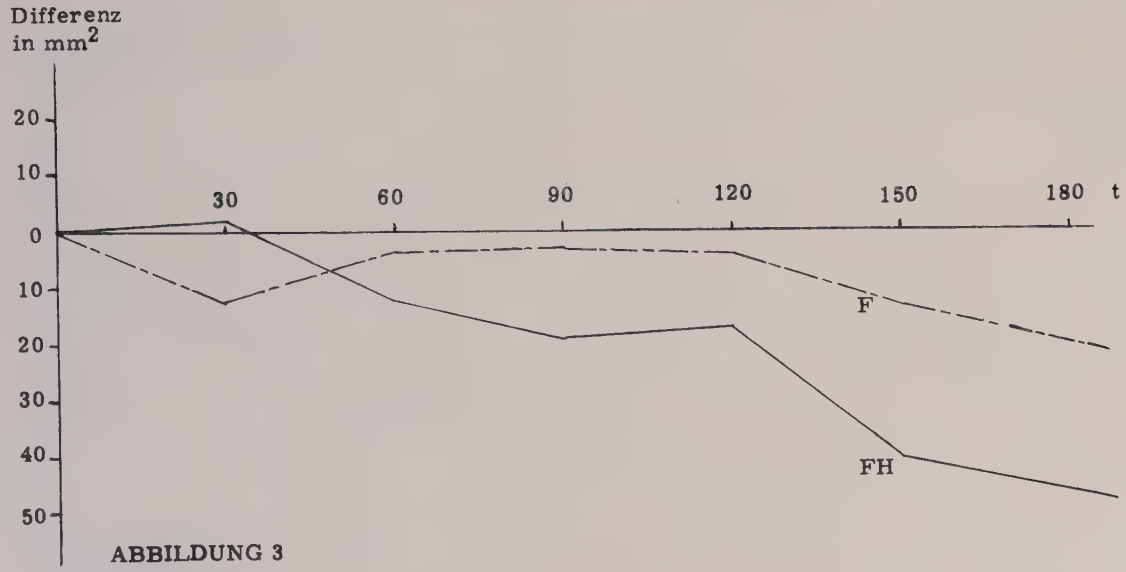

Differenz
in mm2
20
10
0
10
20
30
40
50
30
60
90
120
150
180
t in min
F
FH

ABBILDUNG 3

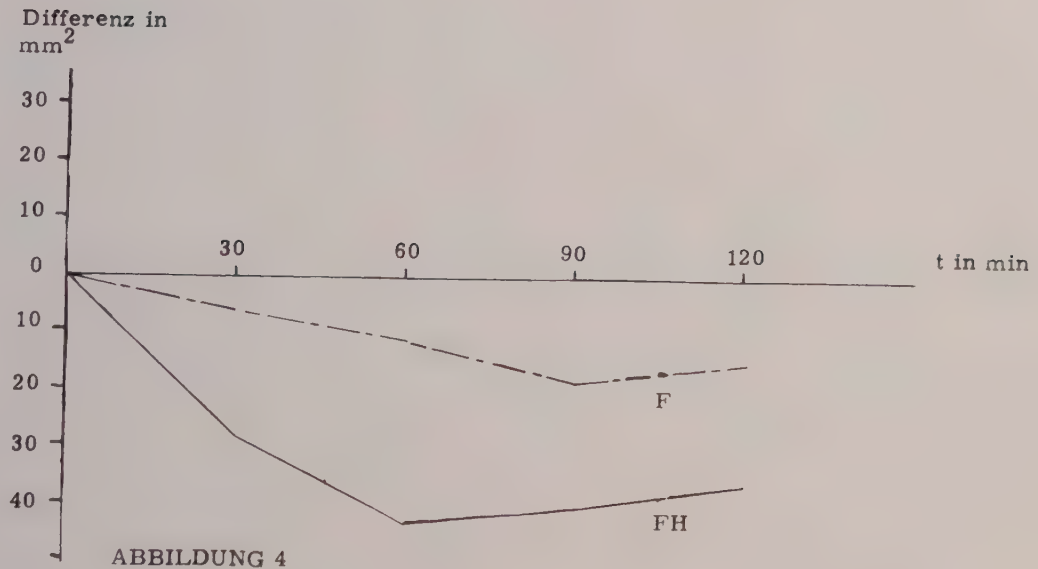


ABBILDUNG 4

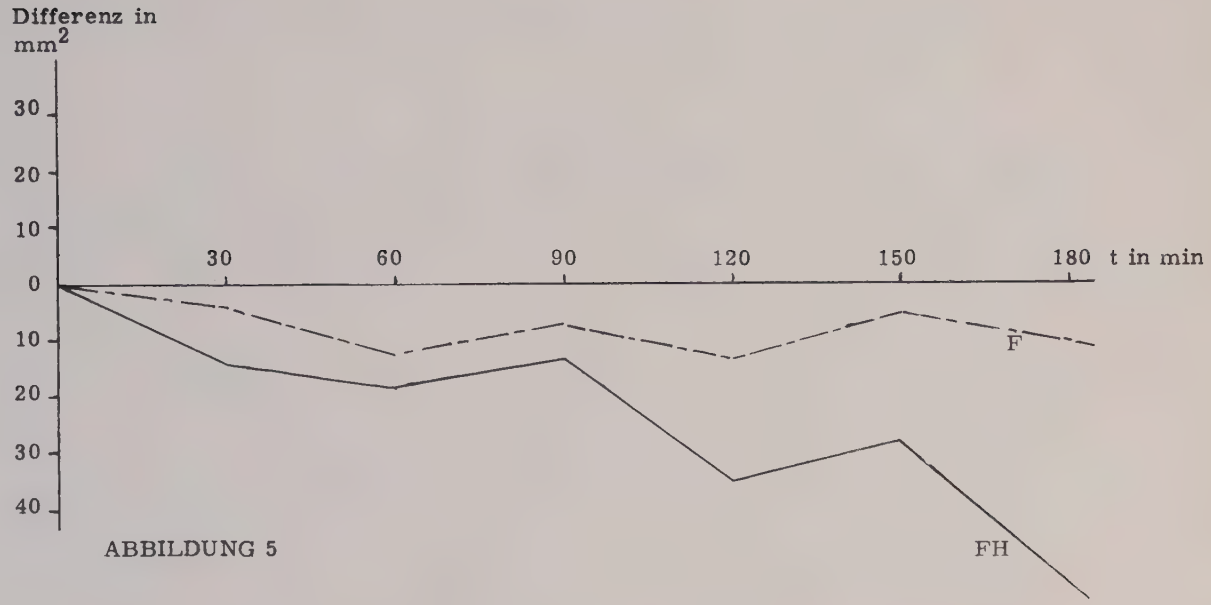
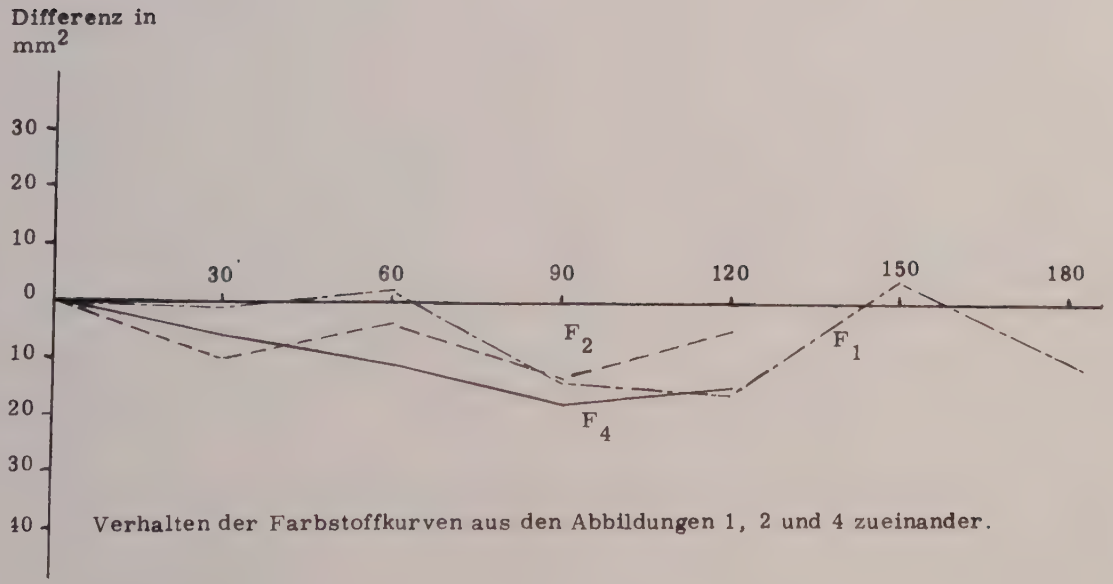
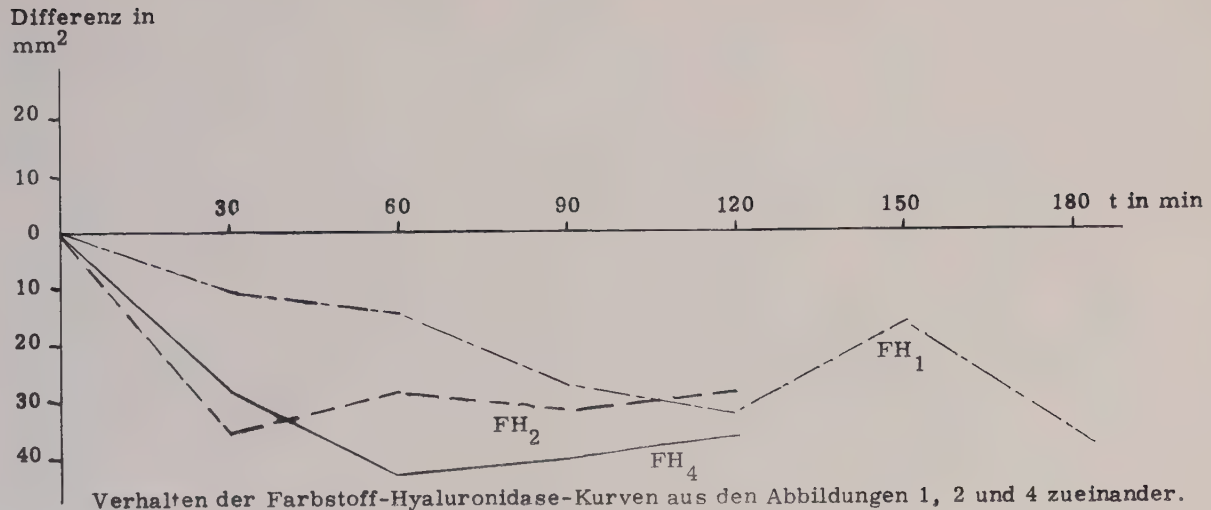

Differenz in
mm2
30
20
10
0
10
20
30
40
30
60
90
120
150
180
t in min
F
FH

ABBILDUNG 5



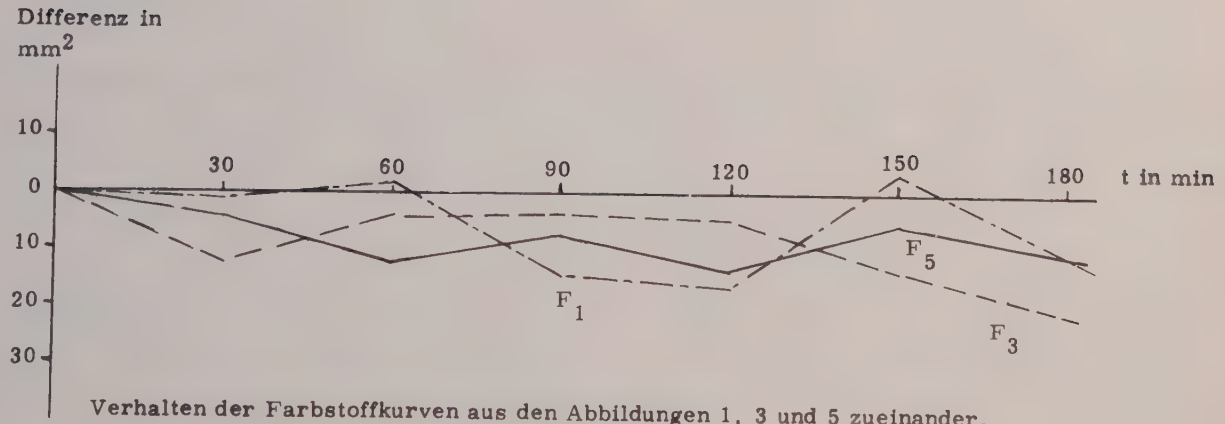
Verhalten der Farbstoffkurven aus den Abbildungen 1, 2 und 4 zueinander.

ABBILDUNG 6



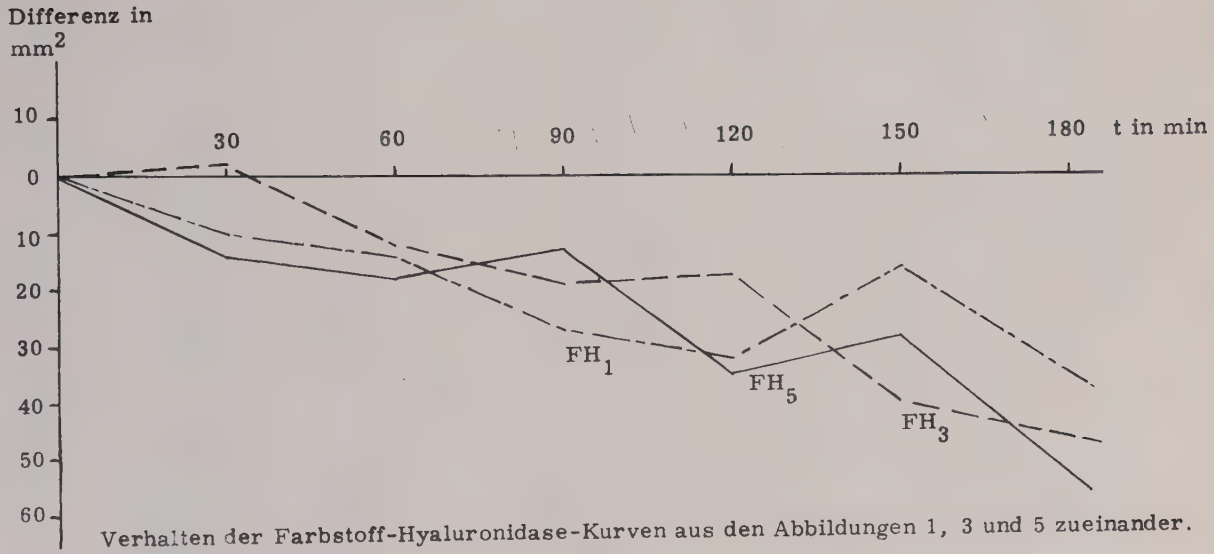
Verhalten der Farbstoff-Hyaluronidase-Kurven aus den Abbildungen 1, 2 und 4 zueinander.

ABBILDUNG 7



Verhalten der Farbstoffkurven aus den Abbildungen 1, 3 und 5 zueinander.

ABBILDUNG 8



Verhalten der Farbstoff-Hyaluronidase-Kurven aus den Abbildungen 1, 3 und 5 zueinander.

ABBILDUNG 9

STATISTISCHE AUSWERTUNG

1. Mathematisch statistische Methodik

Die vorliegenden Meßreihen werden zunächst durch die statistischen Maßzahlen, dem arithmetischen Mittel $\bar{x}$ und Standardfehler $S_{\bar{x}}$ beschrieben. Für die Prüfung von Unterschieden sind die Einflüsse versuchsbedingter Variabilitäten zu berücksichtigen. In einer zweifachen Varianzanalyse läßt sich die Gesamtvarianz nach drei Komponenten hin trennen und damit unter Berücksichtigung des Einflusses der Variabilität zwischen den Tieren und der Komponente zwischen den Stufen eine Restvarianz bestimmen, die als methodischer Fehler bezeichnet werden kann. Aus seinem Verhältnis zur Komponente zwischen den zeitlichen Beobachtungsstufen ist mittels des Quotiententests (empirische Prüfgröße $F_{emp.}$) nach Fisher auf tatsächlich bestehende Unterschiede zwischen der beobachteten Farbstoffausbreitung verschiedener Zeiten zu schließen, soweit die zugelassene Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 0,05$ in der zugehörigen Verteilung der Prüfgröße F nicht überschritten wird.
Als Ergebnisse der mathematisch statistischen Analyse sind die Freiheitsgrade FG der Varianzkomponenten, Mittlere Abstandquadrate MAQ, die empirischen Varianzquotienten F_{emp}, sowie die daraus bestimmte Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben, die bedeutet, wie wahrscheinlich ein beobachteter Unterschied ist.
Die Ausbreitung der Quaddeln in % bezieht sich auf die Kontrollwerte vor Applikation.

2. Statistische Bewertung und Interpretation der experimentellen Untersuchungen

Versuchsreihe 1:

Die Versuchsreihe zur Bestimmung der hyaluronidasehemmenden Wirkung des 2 %igen Novocains über 60, 120 bzw. 180 Minuten führte zu Farbstoffausbreitungen, deren Meßwerte sich statistisch wie folgt zusammenfassen lassen.

TABELLE 1

Versuchsreihe	Anzahl Beob.	Zeit nach Vers.-beginn (min.)	Farbstoff-Quaddeln: Mittel $\bar{x}$	Farbstoff-Quaddeln: Standardfehler $\pm s_{\bar{x}}$	Farbstoff-Quaddeln: Ausbreitung	Farbstoffhyal.-Quaddeln: Mittel x	Farbstoffhyal.-Quaddeln: Standardfehler $\pm s_{\bar{x}}$	Farbstoffhyal.-Quaddeln: Ausbreitung / Hemmung
I.) Kontrollwerte K und Meßwerte der Farbstoffausbreitung bei Applikation von Novocain 2 %:								
	6	K	112,5	3,6		218,1	5,9	
	6	30	111,3	3,5	- 1 %	207,8	7,0	- 5 %
	6	60	114,1	5,8	+ 1 %	203,6	4,8	- 7 %
	6	K	133,0	3,8		226,5	6,1	
	6	90	119,0	4,3	-10 %	198,5	5,4	- 12 %
	6	120	117,1	3,8	-12 %	194,0	4,2	- 14 %
	6	K	119,1	8,3		218,8	7,8	
	6	150	122,8	2,4	+ 3 %	203,1	8,8	- 7 %
	6	180	108,5	5,7	- 9 %	184,5	9,8	- 16 %

TABELLE 2

Varianzanalysen zur Versuchsreihe mit Novocain 2 %

Beob. zeiten in min	Varianz-komponente	FG	MAQ	F_{emp}	Signifikanz-entscheidung mit P
Farbstoffquaddeln					
K-30'-60'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	260,40	3,50	P < 0,05
	zw. Stufen	2	11,00	0,14	P > 0,10
	Rest	10	74,40		
K-90'-120'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	15,40	0,11	P > 0,11 Effekt
	zw. Stufen	2	450,00	3,25	P < 0,10 angedeutet
	Rest	10	138,40		
K-150'-180'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	156,20	0,62	P > 0,10
	zw. Stufen	2	332,50	1,33	P > 0,10
	Rest	10	249,40		
Farbstoffhyaluronidasequaddeln					
K-30'-60'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	319,60	1,93	P > 0,10
	zw. Stufen	2	334,50	2,02	P > 0,10
	Rest	10	164,90		
K-90'-120'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	335,40	3,78	P < 0,05 Effekt
	zw. Stufen	2	1860,50	21,04	P < 0,001 sehr sign.
	Rest	10	88,40		
K-150'-180'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	336,40	0,62	P > 0,10 Effekt
	zw. Stufen	2	1826,00	3,38	P < 0,10 angedeutet
	Rest	10	540,00		

Kontrollwerte K und Testergebnisse der Farbstoffausbreitung bei Applikation von Novocain.

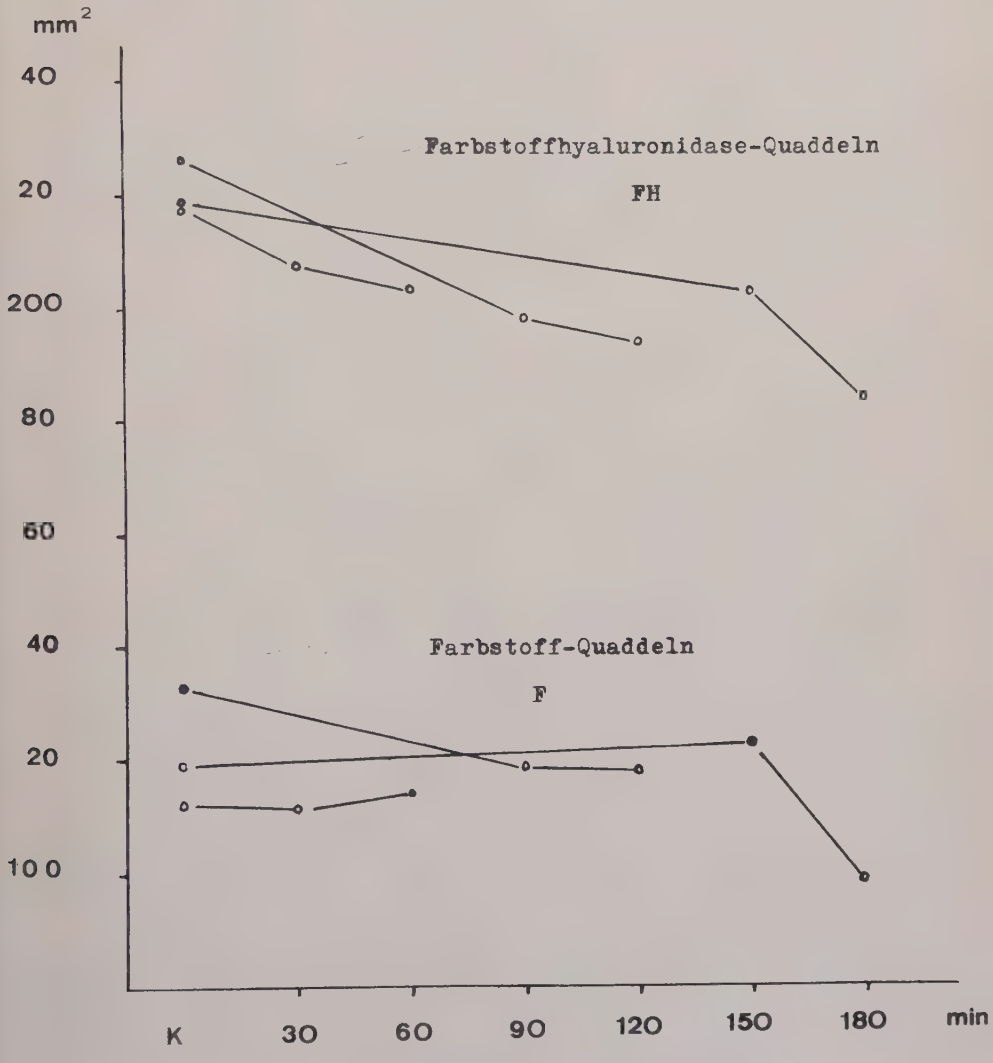


Abbildung 1o

Versuchsreihe 2 und 3:

Bezüglich der statistischen Bewertung und Interpretation dieser beiden Reihen darf auf die Dissertation von Osterburg (15) verwiesen werden.

Versuchsreihe 4 und 5:

Die Untersuchung der Hyaluronidaseaktivität bei gleichzeitiger Verabreichung von Huminsäure und Novocain über 60, 120 und 180 Minuten führte zu Farbstoffausbreitungen, deren Meßwerte in den folgenden Tabellen statistisch ausgewertet sind.

TABELLE 3

Versuchsreihe	Anzahl Beob.	Zeit t nach Vers.-beginn (min.)	Farbstoff - Quaddeln: Mittel $\bar{x}$	Farbstoff - Quaddeln: Standardfehler $\pm s_{\bar{x}}$	Farbstoff - Quaddeln: Ausbreitung	Farbstoffhyal. - Quaddeln: Mittel $\bar{x}$	Farbstoffhyal. - Quaddeln: Standardfehler $\pm s_{\bar{x}}$	Ausbreitung / Hemmung
IV. Kontrollwerte K und Meßwerte der Farbstoffausbreitung bei Applikation von:								
a) Huminsäure, Verdünnung 1 : 10 und Novocain 2 %								
	6	K	123,6	3,1		232,5	4,4	
	6	30	117,8	2,8	- 5 %	204,8	8,8	- 12 %
	6	60	112,8	4,7	- 9 %	190,0	1,7	- 18 %
	6	K	133,0	3,0		224,0	7,7	
	6	90	115,0	6,9	- 13 %	183,6	6,3	- 18 %
	6	120	118,1	3,1	- 11 %	188,1	4,7	- 16 %
b) Huminsäure, Verdünnung 1 : 500 und Novocain 2 %								
	6	K	117,5	3,2		204,8	6,0	
	6	30	113,1	4,6	- 4 %	191,0	10,5	- 7 %
	6	60	105,0	5,6	-11%	187,3	2,1	- 8 %
	6	K	123,6	5,7		212,3	5,5	
	6	90	116,3	3,1	- 6 %	199,5	3,6	- 6 %
	6	120	109,6	1,8	-11 %	177,3	5,1	-16%
	6	K	126,5	6,3		232,5	4,6	
	6	30	121,5	3,1	- 4 %	203,8	12,2	- 12 %
	6	60	115,8	7,2	- 8 %	178,5	12,7	- 28 %

TABELLE 4

Varianzanalysen zur Versuchsreihe mit Huminsäure, Verdünnung 1:10, und Novocain 2 %

Beob. zeiten in min	Varianz-komponente	FG	MAQ	F_{emp}	Signifikanz-entscheidung mit P
Farbstoffquaddeln					
K-30'-60'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	48,00	0,49	P > 0,10
	zw. Stufen	2	176,50	1,81	P > 0,10
	Rest	10	97,10		
K-90'-120'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	285,80	4,73	P < 0,05 Effekt
	zw. Stufen	2	554,00	9,20	P < 0,01 sehr sign.
	Rest	10	60,20		
Farbstoffhyaluronidasequaddeln					
K-30'-60'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	221,60	1,12	P > 0,10 Effekt
	zw. Stufen	2	2791,50	14,24	P < 0,001 sehr sign.
	Rest	10	195,90		
K-90'-120'	gesamt	17			
	zw. Tieren	5	270,40	1,15	P > 0,10 Effekt
	zw. Stufen	2	2931,00	12,48	P < 0,01 sehr sign.
	Rest	10	234,70		

TABELLE 5

Varianzanalysen zur Versuchsreihe mit Huminsäure, Verdünnung 1:500, und Novocain 2 %

Beob. zeiten in min	Varianz-komponente	FG	MAQ	F_{emp}	Signifikanz-entscheidung mit P	
Farbstoffquaddeln						
K-30'-60'	gesamt	17				
	zw. Tieren	5	203,20	2,25	P > 0,10	
	zw. Stufen	2	241,50	2,67	P > 0,10	
	Rest	10	90,10			
K-90'-120'	gesamt	17				
	zw. Tieren	5	184,40	4,08	P < 0,05	Effekt
	zw. Stufen	2	294,50	6,53	P < 0,01	sehr sign.
	Rest	10	45,00			
K-150'-180'	gesamt	17				
	zw. Tieren	5	402,40	3,84	P < 0,05	
	zw. Stufen	2	181,00	1,63	P > 0,10	
	Rest	10	104,60			
Farbstoffhyaluronidasequaddeln						
K-30'-60'	gesamt	17				
	zw. Tieren	5	537,60	2,90	P < 0,10	
	zw. Stufen	2	511,00	2,76	P > 0,10	
	Rest	10	185,10			
K-90'-120'	gesamt	17				
	zw. Tieren	5	161,00	1,23	P > 0,10	Effekt
	zw. Stufen	2	1881,00	14,42	P < 0,01	sehr sign.
	Rest	10	130,40			
K-150'-180'	gesamt	17				
	zw. Tieren	5	1054,80	2,24	P > 0,10	Effekt
	zw. Stufen	2	4379,50	9,33	P < 0,01	sehr sign.
	Rest	10	469,20			

Kontrollwerte K und Testergebnisse der Farbstoffausbreitung bei gleichzeitiger Applikation von Huminsäure und Novocain.

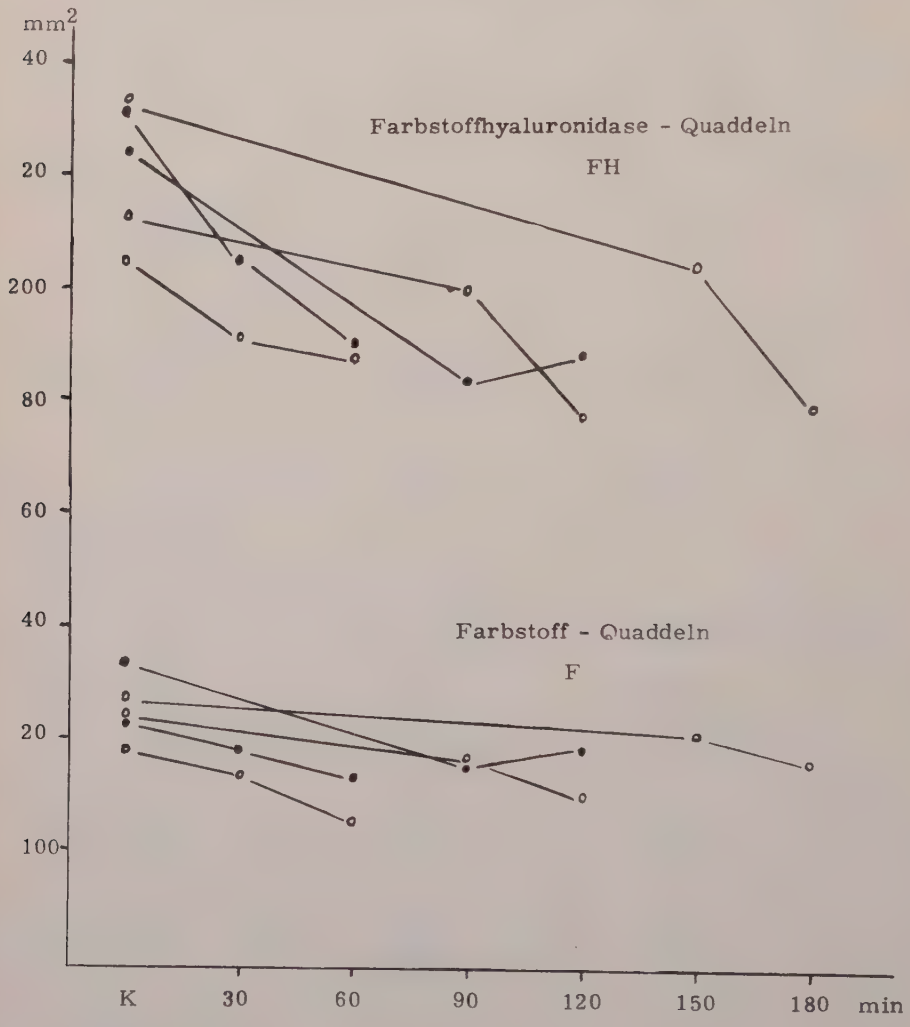


ABBILDUNG 11

- ● bezeichnet Verdünnungsreihe 1 : 10 und Novocain 2 %
- o bezeichnet Verdünnungsreihe 1 : 500 und Novocain 2 %

nterpretation der Testergebnisse

Die Farbstoffquaddeln sprechen bei alleiniger Applikation von Novocain nicht an, deutlich hingegen die Farbstoffhyaluronidasequaddeln. Dabei scheint der deutlichste Hemmeffekt erst nach den ersten 60 min nach Applikation einzusetzen.
Bei kombinierter Applikation der Huminsäure und Novocain zeigen bereits die gesetzten Farbstoffquaddeln zum ungefähren Zeitpunkt um 120 min nach Applikation eine signifikante Wirkung ($P < 0,01$) bei beiden Verdünnungen 1 : 10 und 1 : 500. Die Farbstoffhyaluronidase-Quaddeln zeigen jedoch demgegenüber einen ausgeprägteren Effekt, der bei der Verdünnung der Huminsäure von 1 : 10 schon 30 und 60 min nach Applikation, bei der Verdünnung von 1 : 500 etwas später, 90 - 120 min nach Applikation, deutlich wird ($P < 0,01$) und zwar deutlicher als mit den einzelnen Komponenten der Verabreichung allein.

Die Kombination der Huminsäure mit der Novocain-Applikation bedeutet wohl eine Verstärkung des hyaluronidasehemmenden Effektes gegenüber den einzelnen Komponenten. Wahrscheinlich ist jedoch die kombinatorische Verstärkung des Hemmeffektes nur bedingt als exakt additiv anzusprechen, da sie von dem zeitlich mehr oder weniger übereinstimmenden Beginn und der Dauer der Wirkung abhängt.

DISKUSSION

Die Untersuchungsergebnisse zeigen zunächst, daß Novocain in der angewendeten Dosierung und Applikation einen hyaluronidasehemmenden Effekt aufweist, der im untersuchten Zeitraum von 180 Minuten einen Maximalwert von 35 mm^2 zeigt. Vergleicht man den in Abbildung 1 dargestellten Kurvenverlauf mit den durch die Huminsäureapplikation in der Verdünnung 1 : 10 gefundenen Werten (Abbildung 2), so fällt auf, daß die durch die Huminsäureapplikation erzielte Hyaluronidasehemmung rascher auftritt. Die Verdünnung 1 : 10 entspricht eine Wirksamkeit von 0,001 mg Huminsäure pro Versuchstier, das sind bei einem mittleren Tiergewicht von 0,272 kg 0,0037 mg Huminsäure pro kg Tiergewicht.
Kombiniert man die Gabe von Huminsäuren mit der des Novocains (Abbildung 4), so zeigt sich eine etwas stärkere Hemmung der Hyaluronidaseaktivität im Vergleich zu der, wie sie durch Huminsäuren allein (Abbildung 2) erzielt wird. Die Differenz dieser beiden Kurven ist jedoch nicht erheblich und dürfte nicht im Sinne einer Wirkungssteigerung zu bewerten sein. Noch weniger auffällig sind die Unterschiede, wenn die Huminsäuren in der Verdünnung von 1 : 500 (0,00002 mg Huminsäure pro Tier, bzw. 0,000073 mg Huminsäure pro kg Tiergewicht) appliciert werden. Hier zeigt sich ein etwa gleichsinniver Verlauf aller Kurven (Abbildungen 1, 3 und 5) und zwar sowohl der Werte nach Huminsäureapplikation, nach Novocainapplikation und nach gleichzeitiger Gabe beider Substanzen.
Bei einer synergistischen Wirkung beider Prüfsubstanzen hätte man besonders zu früheren Versuchszeitpunkten eine Verstärkung der hyaluronidasehemmenden Wirkung erwarten sollen. Es kann somit, zumindest bei der durchgeführten Versuchsanordnung, ein synergistischer Effekt der vermutlich im Moor wirksamen Substanzen und des Novocains nicht bewiesen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe einer auf dem Spreading-Effekt beruhender Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel-Methode im Tierexperiment gezeigt, daß Novocain eine hyaluronidasehemmende Wirkung aufweist. Diese wird jedoch wesentlich später deutlich als die rascher auftretende Hemmung der Hyaluronidaseaktivität durch Huminsäuren aus dem Moorvorkommen eines südbrasilianischen Moores.
Nach kombinierter Anwendung von Novocain und Huminsäuren in verschiedenen Verdünnungen änderte sich die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität nur unwesentlich im Vergleich zu der durch Huminsäuren allein erzielten Wirkung, zumindest bei der durchgeführten Versuchsanordnung.
Auch statistisch sind die Bedingungen nicht genau anzugeben, unter denen die Wirkungen in der kombinierten Applikationsform rein additiv wären.

An dieser Stelle darf ich Herrn Privatdozent Dr. H. MATHIES für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Gestaltung der Arbeit vielmals danken.
Für die Anregung zu den Untersuchungen und die Isolierung der Huminsäure aus den Moorproben eines südbrasilianischen Moorvorkommens möchte ich Herrn Dr. R. JOACHIMOVITS (Universidade Santa Maria, Rio Grande do Sul, Südbrasilien) danken.
Herrn Professor Dr. W. SEITZ danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Untersuchungen an seinem Institut,
Herrn Walter Joh. Ziegler für die statistische Berechnung der Versuchsergebnisse.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Mathies,H.: Die Pharmazie, 12 (1957), 1-8

2) MATHIES,H.: Med. Klinik, 52 (1957), 1676-1679

3) Good,F.: Dtsch. med. Wochenschrift, 76 (1951), 830

4) Fleckenstein,K.:
Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzausschaltung.
Verlag Steinkopff, Frankfurt 1950

5) MATHIES,H.: Med. Monatsschrift, 10 (1958), 685-688

6) MATHIES,H. und v. Werther,G.:
Zeitschrift für angewandte Bäder- und Klimaheilkunde, 8 (1958), 503-515

7) MATHIES,H.: Zeitschrift für Rheumatologie, 18 (1959)

8) Schliephake,E. und Smets,R.:
Münchner med. Wochenschrift, 97 (1955), 56-59

9) Kowarschik,J.: Internationaler Kongreß für Moorforschung vom 31.5. - 3.6.1956 in Lindau i. B.

10) Lachmann,H.: Die Heilkunst, 69 (1956), 9

11) Stojanoff,S.: Dissertation München 1960

12) Lutz,D.: Dissertation München 1961

13) Achtiani,A.: Dissertation München 1961

14) Haupt,E.: Dissertation München 1959

15) Osterburg,J.: Dissertation in Vorbereitung

16) Joachimovits,R.:
Persönliche Mitteilung

LEBENSLAUF

Am 1. April 1941 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Otto Erhard und seiner Ehefrau Irene in München geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule in Stockdorf bei München in den Jahren 1947 bis 1951 ging ich fünf Jahre in das Humanistische Gymnasium München-Pasing und anschließend in das Theresiengymnasium in München, wo ich im Juli 1961 die Reifeprüfung ablegte.
Mein medizinisches Studium begann ich im Wintersemester 1961/1962 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Im Sommersemester 1964 beendete ich dort mit der ärztlichen Vorprüfung mein vorklinisches Studium. Während der folgenden Semester besuchte ich die Ludwig-Maximilians-Universität München und habe dort im Dezember 1967 mein Staatsexamen abgelegt.